低温胁迫下外源油菜素内酯对冬小麦*REVEILLE 7-like*基因表达的影响

陈宇姝[1]，张军保[1]，王雪松[1]，邵庆一[1]，杨森[1]，曹佳昂[1]，刘丽杰[*1,2]
（1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院，黑龙江 齐齐哈尔 161006；2. 黑龙江省农用生物制剂产业化协同创新中心，黑龙江 齐齐哈尔 161006）

摘　要：‘东农冬麦 1 号（Dn1）’是首个能在严寒地带大面积种植、返青率超过 85%的强抗寒冬小麦品种。为探索冬小麦中 *REVEILLE* 7-*like* 基因的功能，以及低温胁迫下外源油菜素内酯（BR）对该基因表达的影响，该研究利用 RT-PCR 法克隆了冬小麦（Dn1）*REVEILLE* 7-*lik*e 基因的 cDNA 序列，并对其进行了生物信息学分析，冬小麦三叶期时叶面喷施 BR，并于 4、0、-10、-25 ℃对冬小麦叶片和分蘖节进行取样，用 qRT-PCR 技术分析该基因在以上不同处理组冬小麦叶片和分蘖节中的表达模式。结果表明：（1）REVEILLES 属于 MYB 类转录因子家族，*REVEILLE* 7-*like* 基因全长 1 251 bp，共编码 416 个氨基酸，编码蛋白为不稳定亲水性蛋白，主要定位于细胞核；（2）REVEILLE 7-like 与节节麦、二粒小麦亲缘关系最近，蛋白序列总相似度为 78.62%；（3）*REVEILLE* 7-*like* 基因启动子包含参与逆境响应、激素响应及 MYB 结合位点的顺式作用元件；（4）表达模式分析发现，对照组中 *REVEILLE* 7-*like* 基因的表达量在 0、-10、-25 ℃时与 4 ℃时相比较均有显著提高。处理组与对照组相比，该基因的表达量在-10 ℃和-25 ℃时均显著提高。综上，推测该基因在冬小麦受到低温胁迫时起重要作用，并且 BR 可以提高该基因的表达，进一步提高冬小麦的耐寒性。

关键词：寒地冬小麦，油菜素内酯，*REVEILLE* 7-*like*，基因克隆，低温胁迫
中图分类号：Q945.3　　　　　　　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**

Effects of exogenous Brassinosteroids on *REVEILLE* 7-*like* gene expression in winter wheat under low temperature stress

CHEN Yushu[1], ZHANG Junbao[1], WANG Xuesong[1], SHAO Qingyi[1],
YANG Sen[1], CAO Jiaang[1], LIU Lijie[*1,2]
(1. *Collegel of Life Sciences and Agriculture and Forestry*, *Qiqihar University*, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China; 2. *Heilongjiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agrobiological Preparation Industrialization*, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: Dongnong Dongmai No.1 (Dn1) is the first strong cold-resistant variety that can be planted in a large area in the cold zone, and the greening rate is over 85%. To explore the function of the *REVEILLE* 7-*like* gene in winter wheat and the effect of exogenous brassinolide (BR) on the expression of this gene under low temperature stress. In this study, the cDNA sequence of *REVEILLE* 7-*like* gene of winter wheat (Dn1) was cloned by RT-PCR, and its bioinformatics analysis was carried out. At the three-leaf stage of winter wheat, BR was sprayed on the leaves,

---

基金项目：黑龙江省省属本科高校基本科研业务费（145309512）； 齐齐哈尔大学研究生创新科研项目（QUZLTS_CX2023022）。
第一作者：陈宇姝（2000—），硕士研究生，主要从事小麦抗寒方面研究，（E-mail）:2297961286@qq.com。
***通信作者：**刘丽杰，博士，教授，主要从事小麦抗寒及大麻雌化方面研究，（E-mail）:liulijie2001@163.com。

and the leaves and tillers of winter wheat were sampled at 4, 0, -10, -25 ℃. The expression patterns of this gene in the leaves and tillers of winter wheat in the above different treatment groups were analyzed by qRT-PCR. The results were as follows: (1) REVEILLES belonged to MYB transcription factor family, and the full length of *REVEILLE 7-like* gene was 1 251 bp, which encoded 416 amino acids. The encoded protein was an unstable hydrophilic protein, mainly located in the nucleus. (2) REVEILLE 7-like had the closest genetic relationship with Aegilops tauschii and Eremmer wheat, and the total similarity of protein sequence was 78.62%. (3) *REVEILLE 7-like* gene promoter contained cis-acting elements involved in adversity response, hormone response and MYB binding site. (4) The expression pattern analysis showed that the expression level of *REVEILLE 7-like* gene in the control group was significantly higher at 0℃, -10℃ and -25℃ than at 4℃, suggesting that the gene might play an important role in winter wheat under low temperature stress. At -10℃ and -25℃, the expression of the gene in leaves and tillering nodes of winter wheat treated with BR was significantly higher than that of the control group, and the expression of the gene in tillering nodes treated with BR was significantly higher than that in leaves. Therefore, when winter wheat was subjected to low temperature stress, BR could improve the expression of the gene and further improve the cold tolerance of winter wheat, and with the decrease of temperature, the promotion of cold tolerance of winter wheat tillering nodes was more significant.
Key words：winter wheat, brassinolide, *REVEILLE 7-like*, gene cloning, low temperature stress

小麦是世界上重要的粮食作物之一，长时间处于 0 ℃以下的生长环境，或在冬眠和春季发芽之间的温度变化容易造成冻害（金善宝，1996）。低温胁迫下，植物叶片通常表现为萎蔫、变黄甚至死亡，且严重影响植物的正常生长发育（Shilpi & Narendra, 2005）。植物的呼吸作用和光合作用也会受到低温胁迫的干扰，对水分、矿物质的吸收减少，植物细胞膜完整性被破坏，从而导致细胞的区室化丧失（Kro1 et al., 2015）。

植物对低温胁迫的响应是一种积极主动的应激过程，低温会诱导相关基因的表达，通过积累小分子抗性物质及抗氧化系统的活化等，缓解低温胁迫造成的伤害，提高植物的抗性（郭子武等，2004）。转录因子通过结合基因启动子上的顺式作用元件激活低温响应基因的表达，从而提高植物的耐低温性，与植物低温胁迫有关的转录因子家族包括 AP2/ERF、NAC、WRKY、MYB、bZIP 等（肖玉洁等，2018）。MYB 是真核生物体内最大的转录因子家族之一，其成员在植物的生长发育、次生物质代谢、生物及非生物胁迫应答等多种生理过程中发挥重要作用（位欣欣和兰海燕，2022）。1987 年 Paz‐Ares 等首次从单子叶植物玉米中克隆出与黄酮类色素合成有关的 *ZmMYBC*1 基因（PAZ‐ARES et al., 1987），通常在植物中 MYB 的 N 端含有一段约 51～52 个氨基酸的保守肽段，把这段保守序列称为 MYB 结构域（刘守梅等，2012）。根据含有 MYB 结构域的数量将其分为四类，包含一个 MYB 结构域的 1R-MYB 家族、以及在 MYB 结构域中包含两个保守的 R2 和 R3 重复序列的 R2R3-MYB 家族、包含 3 个 MYB 结构域的 R1R2R3-MYB 型和 4 个 MYB 结构域的 4R-MYB 型（KATIYA et al., 2012）。前人研究发现，*AtMYBC*1 能够负调节 CBF 非依赖途径中拟南芥的耐冷性（Zhai et al., 2010），*OsMYB*2 过表达植株比野生型植株更耐盐、冷、干旱胁迫，与胁迫相关的基因（包括 *OsLEA*16，*OsRab*2*A* 和 *OsDREB*2*A*）上调更大（Yang et al., 2012），*SlMYB*102 在番茄中受低温、ABA 以及盐等 3 种非生物胁迫诱导，在 3 种胁迫诱导下，*SlMYB*102 基因表达量均上升（Chen et al., 2013; 赵爽，2014）。REVEILLES （RVEs）是一类与植物生物钟相关的 MYB 类转录因子（Fogelmark & Troein, 2014），*RVE*4、*RVE*6 和 *RVE*8 基因是拟南芥生物钟的正向调节因子（Hsu et al., 2013），在红梨果皮中发现 4 个 *PbREVEs* 基因可以促进花青素的合成（Li et al., 2020），生物钟相关基因的作用几乎延伸到植物生长和发育的

各个方面，包括对非生物胁迫的反应（Nagel et al., 2015），例如拟南芥中的 *REVEILLE*1 突变体对低温表现出更强的耐受性（Meissner et al., 2013），烟草中 *SgRVE*6 可以显著提高植株对冷害的抗性（Chen et al., 2020），*RVE*7 基因能够感知温度变化并进一步作出响应的机制（田莹莹，2022），*REVEILLES* 基因在小麦、拟南芥、玉米、番茄、烟草等大多数植物中均有表达。因此推测本文研究的 *REVEILLE* 7-*like* 基因可能参与作物适应冷环境反应的调节，并有助于优越冬小麦耐寒性。

油菜素内酯（brassinosteroid，BR）在 20 世纪 70 年代首次被发现，是一类具有极高生物活性的甾醇类化合物（Louse et al., 1998），有促进种子萌发、幼苗生长、提高光合作用效率和提高抗逆性等作用（文海等，2006；凯荣等，2008；Bajguz, 2009）。如外源施用 BR 可以增强萝卜、辣椒、油菜的抗旱性（Kagale et al., 2006; Mahesh et al., 2013; Hu et al., 2013），还可以提高灯笼椒、番茄、拟南芥等植物的抗寒性（Kagale et al., 2006; Wang et al., 2012；Aghdam, 2014），许多与 BR 生物合成及信号转导相关的基因相继被鉴定、克隆，利用转基因技术转化进不同植株，可以增强植株抵御逆境的能力（陈晨等，2022）。研究表明，BR 可以有效减轻低温对玉米的危害，保持幼苗在寒冷环境下的正常特性（Sun et al., 2020），冷胁迫下 BR 处理拟南芥会诱导与寒胁迫有关基因的表达量增加，增强植株耐寒性（Aghdam, 2014），BR 还可以增强冬小麦的新陈代谢，提高冬小麦幼苗中 *ERF*003、*WRKY*28-*like* 等相关抗寒基因的表达（Ding et al., 2023）。尽管上述多个研究揭示了 *REVEILLE* 7-*like* 基因在多种植物非生物胁迫响应方面的关键作用，以及 BR 可以提高相关抗逆基因的表达进一步提高植物抵御非生物胁迫的能力，但 BR 对冬小麦中 *REVEILLES* 基因表达的影响还未见报道。本实验以冬小麦‘东农冬麦 1 号’为研究对象，依托不同低温胁迫下外源油菜素内酯处理的冬小麦转录组数据，筛选得到差异表达基因 *REVEILLE* 7-*like*，采用基因克隆、生物信息学和 qRT-PCR 等方法，通过鉴定该基因的结构、功能及在冬小麦中的表达情况，拟探讨以下问题：（1）REVEILLE 7-like 蛋白结构及理化性质、亚细胞定位情况；（2）冬小麦与多物种 *REVEILLE* 7-*like* 的启动子顺式作用元件特征；（3）*REVEILLE* 7-*like* 在冬小麦中的抗寒功能以及对 BR 激素信号的应答，初步阐述 BR 处理后该基因在冬小麦应对低温胁迫时的功能表现。

东北冬季平均气温在-20 ℃左右，东农冬麦 1 号（Dn1）是首个能在黑龙江省严寒地带大面积种植、返青率超过 85%的强抗寒冬小麦品种，因此本研究对进一步提高冬小麦产量和耐寒性具有重要意义，也为进一步揭示 MYB 家族基因 *REVEILLE* 7-*like* 在冬小麦应对低温胁迫过程中的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

实验材料为寒地冬小麦品种‘东农冬麦 1 号（Dn1）’，由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院植物代谢生理实验室提供。于 2022 年 9 月种于试验田中，用 BR 喷施处于三叶期的冬小麦叶片（浓度为 0.1 $mg·L^{-1}$），喷施标准为叶片表面全部湿润，共喷施 3 次，每次间隔 2 d，以喷施蒸馏水作为对照。连续 10d 田间最低温度平均值为 4、0、-10、-25 ℃时对冬小麦叶片和分蘖节进行取样，清洗干净、锡箔纸包裹后用分装袋收集、迅速液氮速冻，于-80 ℃冰箱储存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 植物总 RNA 的提取及反转录

取 0.2 g 小麦的叶片和分蘖节，采用 Trizol 法提取小麦 RNA，提取后用琼脂糖凝胶电泳及测量 $OD_{260/280}$ 的方法检测其是否符合后续试验标准，检测成功后储存备用。用反转录试剂盒 SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit User Manual（易锦生物技术有限公司，广州）

合成 cDNA 模板链，用 PCR 扩增管家基因验证模板是否提取成功，成功后将模板置于-20 ℃冰箱储存。

1.2.2　*REVEILLE 7-like* 基因的克隆

从‘东农冬麦 1 号’转录组数据中得到 *REVEILLE* 7-*like* 基因的序列全长，在 NCBI 上进行比对，比对结果一致，用软件 Primer 5.0 设计该基因全长序列的特异性引物 *REVEILLE* 7-*like* 1F/1R（表 1），构建 20 μL PCR 反应体系，反应程序如下：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s、55 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 90 s，共进行 30 个循环，72 ℃终延伸 10 min。先胶回收、与 pMD18-T Vector 载体相连（Takara 北京），再将连接产物转入到大肠杆菌感受态细胞，培养 14 h 挑单菌落摇 14 h 后进行菌液 PCR，条带位置正确，提质粒，送宝日医生物技术（北京）公司测序。

1.2.3　REVEILLE 7-like 蛋白的生物信息学分析

ProtParam 在线网站（http://web.expasy. org/cgi-bin/protparam/）分析 REVEILLE 7-like 蛋白的分子量、等电点等理化性质；用 Clustal Omega（https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/）在线软件进行氨基酸多序列比对；用 plantcare（http://web.webtools/plantcare/html/）进行蛋白的启动子预测；用 Protscale 软件（http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/）分析 REVEILLE 7-like 蛋白的亲、疏水性；用软件 SOPMA 和 Swiss Model 对该蛋白的二、三级结构进行预测和建模。利用软件 MEGA7.0 中 Neighbor-Joining（NJ）法构建 REVEILLE 7-like 蛋白与多物种的系统发育树，并通过 MEME-Submission（https://meme-suite.org//meme/）软件分析蛋白的保守结构域和保守基序（motif）。

1.2.4　*REVEILLE 7-like* 基因的表达量分析

由生工生物工程股份有限公司（上海）合成 *REVEILLE* 7-*like* 基因的 qRT-PCR 引物，及内参基因 Actin 引物（表 1），根据 TB Green Premix Ex Taq™ 说明书设计 20 μL 反应体系，反应程序如下：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s、60 ℃退火延伸 34 s，共 40 个循环。设置 3 次生物学重复，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法和 SPSS 软件对实验数据进行分析和处理。

表 1　实验所用引物

Table. 1　Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5′－3′) Sequence (5′－3′)	用途 Purpose
REVEILLE 7-like-1F	ATGGCTCGTTTTCAGGAAACCAA	克隆基因全长
REVEILLE 7-like-1R	TTACAAGCAGAGCCTGGTCATCTCT	Full-length cloning
REVEILLE 7-like-2F	AGGTCAACAGCACCAGCAACAG	荧光定量
REVEILLE 7-like-2R	GGGCTCACACGCTCTCTCAAAC	qRT-PCR
TaActin-F	CCTTAGTACCTTCCAACAGATGT	荧光定量内参基因
TaActin-R	CCAGACAACTCGCAACTTAGA	Reference gene of qRT-PCR

2 结果与分析

2.1 *REVEILLE 7-like* 基因的克隆及序列分析

用反转录获得的 cDNA 作为模板，表 1 中的 *REVEILLE* 7-*like* 1F/1R 引物进行 PCR 扩增，可得到 1 251 bp 左右的条带（图 1），将序列提交到 NCBI 上比对可知，*REVEILLE* 7-*like* 基因序列全长 1 735 bp，开放阅读框（open reading frame，ORF）1 251 bp，共编码 416 个氨基酸。

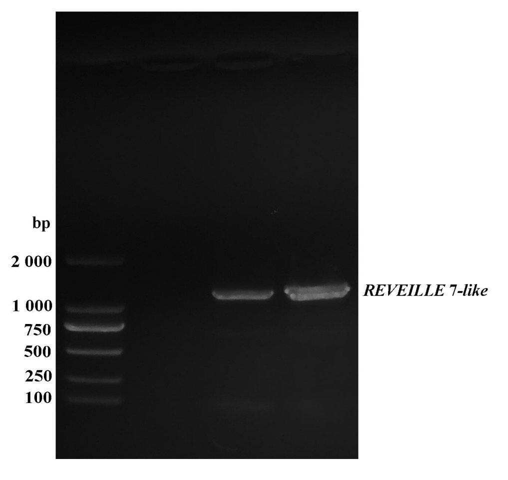


图 1 东农冬麦 1 号 *REVEILLE 7-like* 基因的扩增结果

Fig.1 The PCR results of *REVEILLE 7-like*

2.2 *REVEILLE 7-like* 基因编码蛋白质的生物信息学分析

2.2.1 REVEILLE 7-like 蛋白的理化性质、亲疏水性及二级、三级结构分析

REVEILLE 7-like 蛋白共编码 416 个氨基酸，分子式为 $C_{1931}H_{3074}N_{578}O_{636}S_{21}$，相对分子质量约为 45 236.40 Da，理论等电点为 7.11，REVEILLE 7-like 蛋白是不稳定亲水性蛋白，不稳定系数 56.71，主要定位于细胞核，该蛋白由 20 种氨基酸组成，其中丝氨酸含量最高，占比为 11.5%，酪氨酸含量最低为 1.7%。*REVEILLE 7-like* 基因编码的蛋白平均亲水指数为 -0.719。利用 SOPMA 软件预测该蛋白的二级结构（图 2：A），其中α螺旋占 26.68%；延伸链占 8.17%；β转角和无规则卷曲各占 1.68%、63.46%。该蛋白的三级结构主要由α螺旋、无规则卷曲组成（图 2：B），因此建模结果和二级结构预测结果一致。

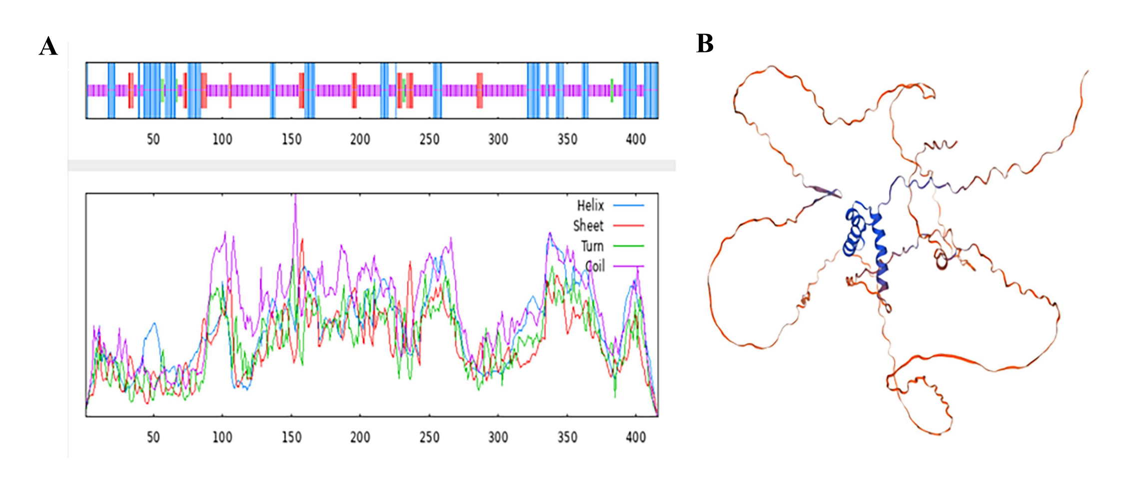


图 2 REVEILLE 7-like 蛋白的二级结构及曲线趋势（A）和三级结构（B）

Fig.2 Secondary structure and curve trend of REVEILLE 7-like protein（**A**） and tertiary structure (**B**)

2.2.2 REVEILLE 7-like 蛋白的系统进化分析和 motif 预测

图 3 为小麦（*Triticum aestivum*）与节节麦（*Aegilops tauschii*）、二粒小麦（*Triticum dicoccoides*）、乌拉图小麦（*Triticum urartu*）、大麦（*Hordeum vulgare*）、黑麦草（*Lolium perenne*）、硬质黑麦草（*Lolium rigidum*）、二穗短柄草（*Brachypodium distachyon*）、谷子（*Setaria italica var. germanica*）、柳枝稷（*Panicum virgatum*）REVEILLE 7-like 蛋白的系统

发育树，可知小麦的 REVEILLE 7-like 蛋白和节节麦、二粒小麦亲缘关系最近，其次较近的是乌拉图小麦和大麦，而与谷子和柳枝稷亲缘关系较远。由图 4 可知，REVEILLE 7-like 蛋白的保守基序在这几个物种中呈现一定的相似性，其中小麦与节节麦、二粒小麦、大麦、黑麦草等 7 种植物都含有 4 个相同的蛋白保守基序，和二穗短柄草、谷子、柳枝稷有 3 个相同的蛋白保守基序。

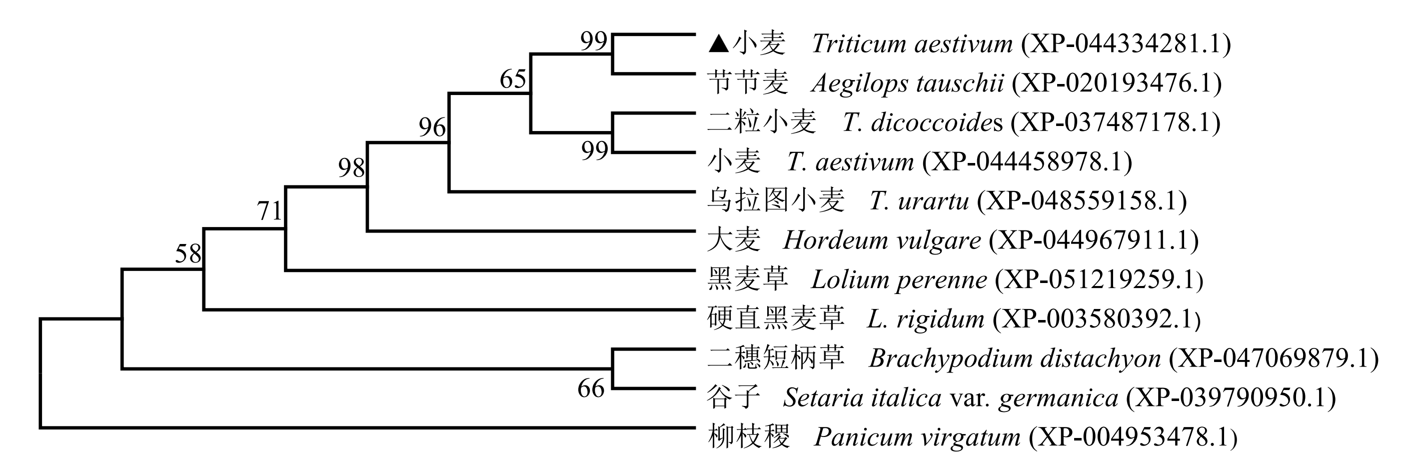


图 3　REVEILLE 7-like 蛋白及其同源氨基酸序列的系统发育树分析

Fig.3　Phylogenetic tree analysis of REVEILLE 7-like and its homologous amino acid sequence

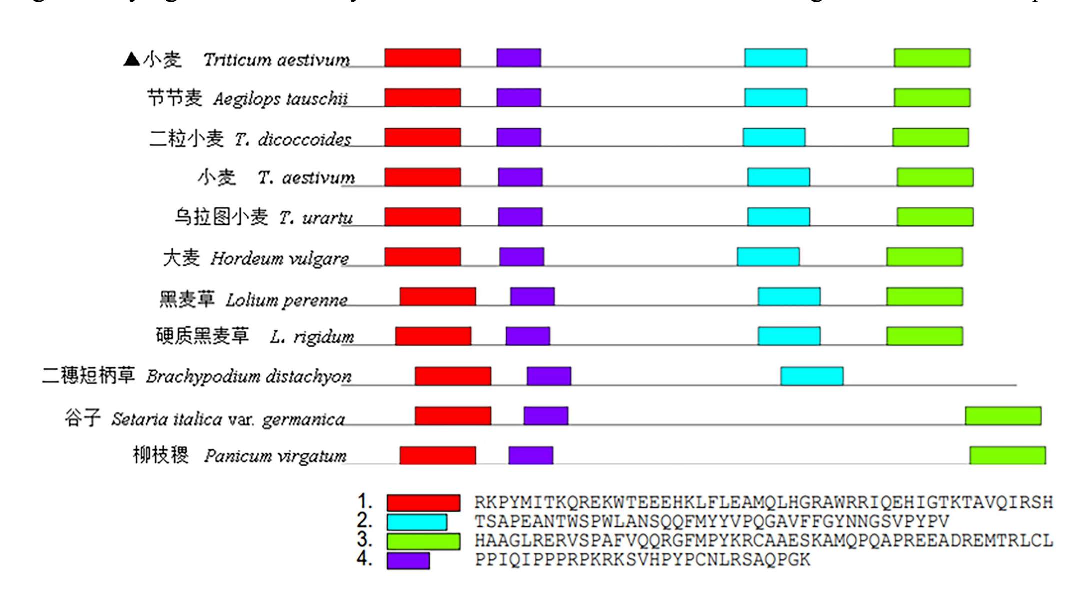


图 4　REVEILLE 7-like 蛋白及其同源氨基酸序列的 motif 预测

Fig.4　Motif prediction of REVEILLE 7-like and its homologous amino acid sequence

2.2.3　*REVEILLE 7-like* 与亲缘关系最近物种的氨基酸序列比对及启动子预测

小麦与其亲缘关系最近的节节麦、二粒小麦、乌拉图小麦、大麦、黑麦草的 REVEILLE 7-like 氨基酸序列进行多序列比对（图 5），发现蛋白序列总相似度为 66.80%，小麦与节节麦、二粒小麦 REVEILLE 7-like 蛋白序列总相似度为 78.62%。小麦与上述物种启动子进行预测（图 6），结果发现 *REVEILLE 7-like* 基因启动子都包含参与逆境响应、激素响应及 MYB 结合位点的顺式作用元件，逆境响应元件主要包括响应干旱和低温环境的作用元件，激素响应元件主要包括油菜素内酯、生长素、赤霉素、水杨酸等作用元件，因此 *REVEILLE 7-like* 基因可能参与小麦等植物抵御低温、干旱等胁迫，应答多种激素信号、调控植物的生长发育过程。

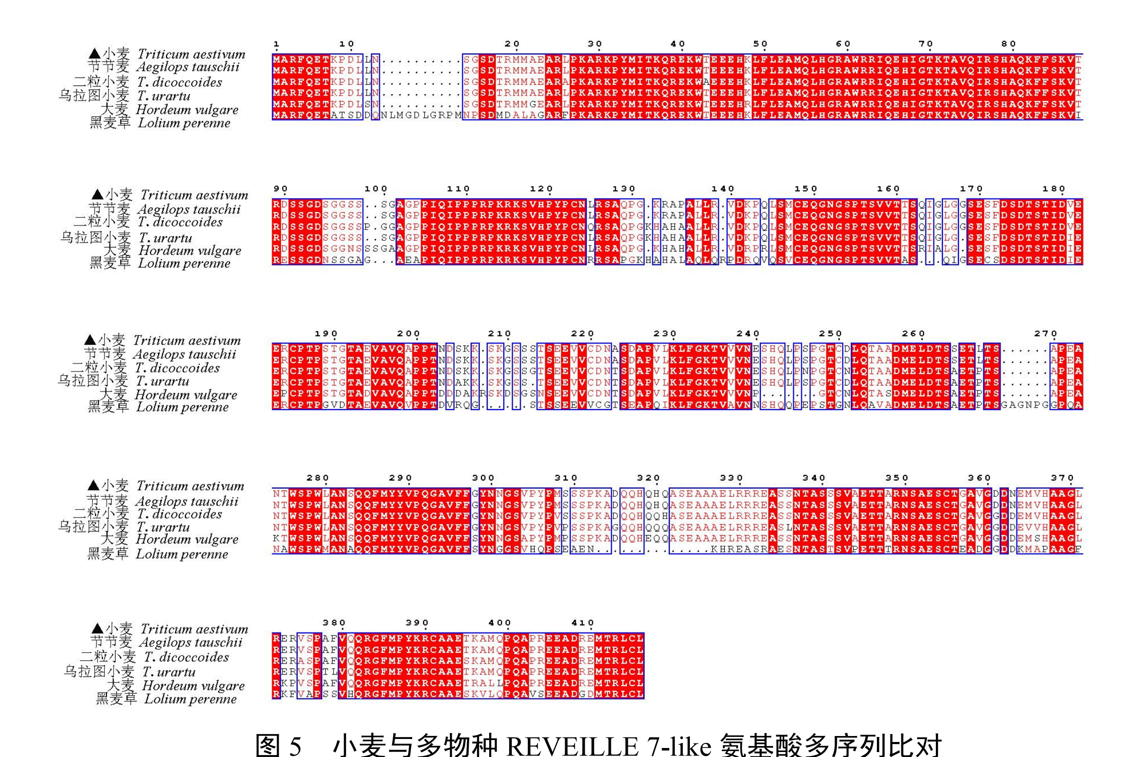


图 5　小麦与多物种 REVEILLE 7-like 氨基酸多序列比对

Fig.5　Amino acid sequence alignment of the REVEILLE 7-like proteins between *Triticum aestivum* and multi-species

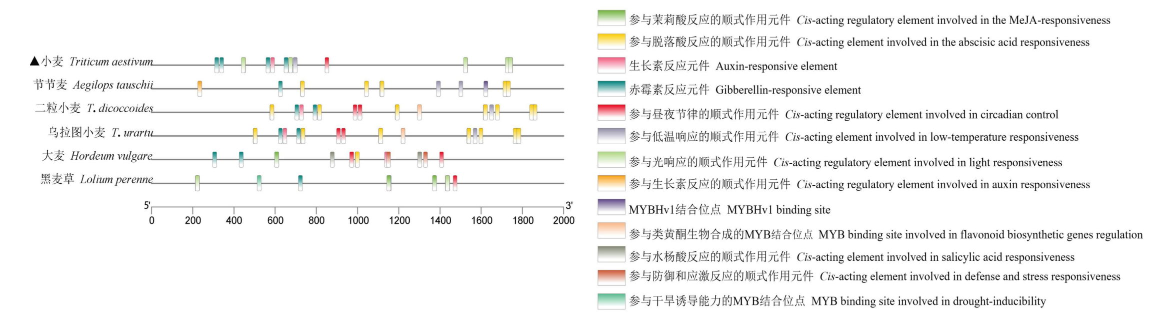


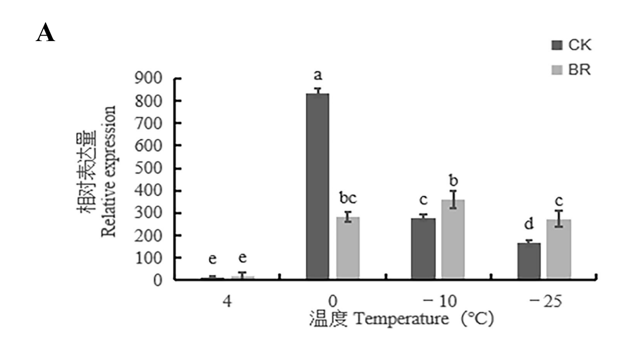
图 6　小麦与多物种 *REVEILLE 7-like* 启动子预测

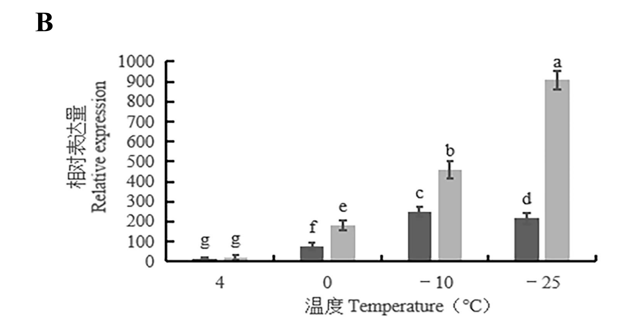
Fig.6　Promoter prediction of the *REVEILLE 7-like* proteins between *Triticum aestivum* and multi-species

2.3 喷施 BR 对冬小麦叶片和分蘖节中 *REVEILLE 7-like* 基因表达的影响

由图 7 可知，在冬小麦叶片中，CK 对照组和 BR 处理组 *REVEILLE 7-like* 基因的表达量随着温度的降低均呈先上升后下降的趋势，分别在 0 ℃和-10 ℃时表达量最高。处理组与对照组相比，该基因的表达量在-10 ℃和-25 ℃时均显著提高（$P<0.05$）。

在分蘖节中，对照组 *REVEILLE 7-like* 基因的相对表达量随着温度的降低先上升后下降，在-10 ℃时相对表达量最高；BR 处理组该基因的相对表达量随着温度的降低均显著上升（$P<0.05$），在-25 ℃时相对表达量最高。处理组与对照组相比，该基因的相对表达量均提高，在 0、-10、-25 ℃时差异显著（$P<0.05$）。





注：同一时期不同小写字母表示存在显著差异（$P<0.05$）。

Note: Different lowercase letters in the same period indicate significant differences（$P<0.05$）.

图 7　不同温度喷施 BR 后冬小麦叶片（A）和分蘖节（B）中 *REVEILLE 7-like* 基因表达量的变化

Fig.7　Changes of *REVEILLE* 7-*like* gene expression in winter wheat leaves (**A**) and tillering nodes (**B**) of winter wheat after spraying BR at different temperatures

3 讨论

MYB 转录因子家族广泛参与植物生长发育、生理代谢、胁迫反应、模式构建、激素信号传导和细胞形态的调节（Ma et al., 2023），不同物种中的 MYB 蛋白如 MdoMYB121、MdSIMYB1、TaMYB3R1、OsMYB3R-2 可调节寒冷、盐和干旱胁迫反应（Dai et al., 2007; Choonkyun et al., 2008; Mao et al., 2011; Cai et al., 2011）。本研究中，小麦的 REVEILLE 7-like 蛋白和节节麦、二粒小麦亲缘关系最近，并且蛋白保守基序呈现较高的相似性，说明 *REVEILLE* 7-*like* 基因在亲缘关系较近的物种间较为保守。因此，本文研究的 MYB 蛋白在小麦中可能具有相似的抗逆功能。转录因子通过结合基因启动子上的顺式作用元件激活低温响应基因的表达，从而提高植物的耐低温性。寒冷胁迫下 MYB 转录因子家族的成员在多种植物中均有表达。例如，拟南芥中 *myb*15 基因过表达可以降低植株耐冻性（Agarwal et al., 2006）；在苹果中，*MdMYB*23 基因与原花青素生物合成的关键调节蛋白 MdANR 的启动子相互作用，并激活其表达以促进原花青素积累和活性氧（ROS）清除，可增强植株耐寒性（An et al., 2018）。本研究中，冬小麦的 *REVEILLE* 7-*lik*e 基因是 MYB 转录因子家族的一员，对 *REVEILLE* 7-*lik*e 基因启动子顺式作用元件分析发现，该基因启动子区域包含参与激素响应、逆境响应及 MYB 结合位点的顺式作用元件，推测冬小麦 *REVEILLE* 7-*lik*e 基因可能参与激素及胁迫诱导的信号通路，具有一定的抗非生物胁迫调控作用。前人研究表明，*REVEILLE*1 突变体对低温表现出更强的耐受性（Meissner et al., 2013）；烟草中 *SgRVE*6 可以显著提高植株对冷害的抗性（Chen et al., 2020）；*RVE*7 基因能够感知温度变化并进一步作出响应的机制（田莹莹，2022）。本研究中，经过表达模式分析发现，随着低温胁迫的加剧，在对照

组冬小麦叶片和分蘖节中 *REVEILLE* 7-*lik*e 基因的表达量都先上升后下降，在 0、-10、-25 ℃时的表达量与 4 ℃时相比较均有显著升高，由此初步推测 *REVEILLE* 7-*like* 基因可能在冬小麦调控低温胁迫时起重要作用，这与在其他物种中发现的 MYB 蛋白可调控植物的低温耐受性基本一致。

BR 在植物干旱、盐、高温、低温和重金属等非生物胁迫响应中起着重要的作用（Li et al., 2021），外施 BR 可以增强萝卜、辣椒、油菜等作物的抗旱性（Kagale et al., 2006; Mahesh et al., 2013; Hu et al., 2013），还可通过提高植物的光合速率、增强碳水化合物代谢、提高抗氧化酶活性、激活抗寒基因表达、激活信号转导途径等方式提高植物的抗寒性（Ali et al., 2018）。但目前有关 MYB 转录因子在冬小麦抗寒领域的研究较少，尤其是与激素之间的相互作用还未见报导。本文研究了低温胁迫下外源 BR 对冬小麦 MYB 转录因子 *REVEILLE* 7-*like* 基因表达量的影响，qRT-PCR 结果显示在冬小麦叶片和分蘖节中，BR 处理后该基因的表达量在-10 ℃和-25 ℃时均显著高于对照组，同时 BR 处理的分蘖节中该基因表达量要显著高于叶片中该基因的表达量。由此推测，在冬小麦受到低温胁迫时 BR 可以提高 *REVEILLE* 7-*like* 基因的表达，进一步提高冬小麦的耐寒性，并且随着温度的下降，对冬小麦分蘖节的耐寒促进作用更加显著，这与其他学者在不同植物中发现 BR 可提高植物的抗寒性以及 BR 可以提高相关抗寒基因的表达结果一致。

本研究对 MYB 转录因子家族基因 *REVEILLE* 7-*like* 进行了克隆，该基因全长 1 251 bp，共编码 416 个氨基酸，编码蛋白为不稳定亲水性蛋白，主要定位于细胞核，在提高冬小麦抗寒过程中具有重要作用，并且外施 BR 可以提高 *REVEILLE* 7-*like* 基因的表达，进一步提高冬小麦的耐寒性。未来可将该基因应用于抗寒育种中，用以改良小麦或其他作物品种的抗寒性，后续可通过相关生物技术手段进一步深入研究 *REVEILLE 7-like* 基因在植物抗逆过程中的作用机制，为植物抗逆性状改良奠定基础。

参考文献

AGARWAL M, HAO Y, KAPOOR A, et al., 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance[J]. Journal of Biological Chemistry, 281(49): 37636-37645.

AGHDAM MS, MOHAMMADKHANI N, 2014. Enhancement of chilling stress tolerance of tomato fruit by postharvest brassinolide treatment[J]. Food and Bioprocess Technology, 7(3): 909-914.

ALI A, LIU YM, DONG RR, et al., 2018. The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: A review[J]. Biological Research, 51(1): 46-61.

AN JP, LI R, QU FJ, et al., 2018. R2R3-MYB transcription factor MdMYB23 is involved in the cold to lerance and proanthocyanidin accumulation in apple[J]. Plant Journal, 96(3): 562-577.

BAJGUZ A, 2009. Brassinosteroid enhanced the level of abscisic acid in chlorella vulgaris subjected to s hort-term heat stress[J]. Journal of Plant Physiology, 166(8): 882-886.

CAI H, TIAN S, LIU C, et al., 2011. Identification of a MYB3R gene involved in drought, salt and col d stress in wheat[J]. Gene, 485(2): 146-152.

CHEN C, CHEN H, NI M, et al., 2022. Research progress of brassinolide in regulating plant growth and development[J]. Scientia Silvae Sinicae, 58(7): 144-155. [陈晨，陈虹，倪铭，等，2022. 油菜素内酯调控植物生长发育的研究进展[J]. 林业科学，58(7)：144-155.]

CHEN S, HUANG HA, CHEN JH, et al., 2020. SgRVE6, a LHY-CCA1-like transcription factor from fin e-stem stylo, upregulates NB-LRR gene expression and enhances cold tolerance in tobacco[J]. Frontiers in Plant Science, 19(11): 1276-1286.

CHEN Y, CHEN Z, KANG J, et al., 2013. AtMYB14 regulates cold tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Mol Biol Report, 31(2): 87-97.
CHOONKYUN J, JUN SS, SANG WH, et al., 2008. Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant physiology, 146(2): 323-324.
DAI X, XU Y, MA Q, et al., 2007. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant physiology, 143(4): 1739-1751.
DING MY, WANG LY, SUN YT, et al., 2023. Transcriptome analysis of brassinolide under low temperature stress in winter wheat[J]. AoB Plants, 15(2): 62-73.
FOGELMARK K, TROEIN C, 2014. Rethinking transcriptional activation in the *Arabidopsis* circadian clock[J]. Plos Computational Biology, 10(7): 2-17.
GUO ZW, LI XL, GAO DS, et al., 2004. Advance in the mechanism of biochemistry and molecular biology in response to cold stress of plant[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 12(2): 54-57. [郭子武，李宪利，高东升，等，2004. 植物低温胁迫响应的生化与分子生物学机制研究进展[J]. 中国生态农业学报，12(2)：54-57.]
HSU PY, DEVISETTY UK, HARMER SL, 2013. Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in *Arabidopsis*[J]. Elife, 2: 47.
HU WH, YAN X, XIAO Y, et al., 2013. 24-Epibrassinosteroid alleviate drought-induced inhibition of photosynthesis in *Capsicum Annuum*[J]. Scientia Horticulturae, 150(4): 232-237.
JIN SB, 1996．Wheat science in China[M]．Beijing: China Agricultural Publishing House. [金善宝，1996. 中国小麦学[M]. 北京：中国农业出版社.]
KAGALE S, DIVI UK, KROCHKO JE, et al., 2006. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis* thaliana and *Brassica Napus* to a range of abiotic stresses[J]. Planta, 225(2): 353-364.
KAI R, WANG J, HE XX, 2008. Effects of sonolactone on seed germination and hypocotyl elongation of five forages[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 26(1): 221-226. [凯荣，王健，贺秀贤，2008. 天然油菜索内酯对五种牧草种子发芽和胚根下胚轴伸长的影响[J]. 干旱地区农业研究，26(1)：221-226.]
KATIYA RA, SMITA S, LENKA SK, et al., 2012. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis*[J]. BMC Genomics, 13: 544-553.
KROL A, AMAROWICZ R, WEIDNER S, 2015. The effeccts of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitisvinifera* L.)leaves[J]. Journal of Plant Physiology, 189(15): 97-104.
LI S, ZHENG H, LIN L, et al., 2021. Roles of brassinosteroids in plant growth and abiotic stress response[J]. Plant Growth Regul, 93: 29-38.
LI X, WU T, LIU H, et al., 2020. REVEILLE transcription factors contribute to the nighttime accumulation of anthocyanins in ‘Red Zaosu’(Pyrus Bretschneideri Rehd) pear fruit skin[J]. International Journal of Molecular Sciences, 21(5): 1634-1645.
LIU SM, SUN YQ, WANG HZ, et al., 2012. Research on transcription factor of MYB in plants[J]. Journal of Hangzhou Normal University: Natural Science Edition, 11(2): 146-153. [刘守梅，孙玉强，王慧中，等，2012. 植物 MYB 转录因子研究[J]. 杭州师范大学学报，11(2)：146-153.]
LOUSE SD, SASSE JM, 1998. Brassinosteroids：essential regulators of plant growth and development[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49(1): 427-451.
MA R, LIU B, GENG X, et al., 2023. Biological function and stress response mechanism of MYB transcription factor family genes[J]. Plant Growth Regul, 42: 83-95.

MAHESH K, BALARAJU P, RAMAKRISHNA B, et al., 2013. Effect of brassinosteroids on germination and seedling growth of radish (*Raphanus sativus L.*)under PEG-6000 induced water stress[J]. American Journal of Plant Sciences, 4(12): 2305-2313.

MAO X, JIA D, LI A, et al., 2011. Transgenic expression of TaMYB2A confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis*[J]. Functional & Integrative Genomics, 11(3): 445-465.

MEISSNER M, ORSINI E, RUSCHHAUPT M, et al., 2013. Mapping quantitative trait loci for freezing tolerance in a recombinant inbred line population of *Arabidopsis Thaliana* accessions tenela and *C*24 reveals REVEILLE1 as negative regulator of cold acclimation[J]. Plant Cell Environ, 36(7): 1256-1267.

NAGEL DH, DOHERTY CJ, PRUNEDA-PAZ JL, et al., 2015. Genome-wide identification of *CCA*1 targets uncovers an expanded clock network in *Arabidopsis*[J]. Natl Acad Sciences, 112(34): 4802-4812.

PAZ-ARES J, GHOSAL D, WIENAND U, et al., 1987. The regulatory c1 locus of *Zea Mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators[J]. The EMBO Journal, 6(12): 3553-3561.

SHILPI M, NARENDRA T, 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444(2): 139-158.

SUN Y, HE Y, IRFAN AR, et al., 2020. Exogenous brassinolide enhances the growth and cold resistance of Maize (*Zea mays L.*) seedlings under chilling stress[J]. Agronomy, 10(4): 488-499.

TIAN YY, 2022. Molecular mechanisms underlying the role of the transcription factor RVE7 in thermomorphogenesis in *Arabidopsis*[D]. Zhejiang: Zhejiang University, 84. [田莹莹，2022. 转录因子RVE7 在拟南芥热形态建成中的生物功能及其分子机理研究[D]. 浙江：浙江大学：84.]

WANG Q, DING T, GAO L, et al., 2012. Effect of brassinolide on chilling injury of green bell pepper in storage[J]. Scientia Horticulturae, 144(6): 195-200.

WEI XX, LAN HY, 2022. Advances in the regulation of plant MYB transcription factors in secondary metabolism and stress response[J]. Biotechnology Bulletin, 38(8)：12-23. [位欣欣，兰海燕，2022. 植物 MYB 转录因子调控次生代谢及逆境响应的研究进展[J]. 生物技术通报，38(8)：12-23.]

WEN H, HUANG LF, MAO WH, et al., 2006. Role of brassinosteroids in the regulation of photosynthetic apparatus in cucumber leaves[J]. Acta Horticulturae Sinica, 33(4): 762-766. [文海，黄黎锋，毛伟华，等，2006. 油菜索内酯对黄瓜苗期叶片光合机构调节作用的研究[J]. 园艺学报，33(4)：762-766.]

XIAO YJ, LI ZM, YI PF, et al., 2018. Research progress on response mechanism of transcription factors involved in plant cold stress[J]. Biotechnology Bulletin, 34(12)：1-10. [肖玉洁，李泽明，易鹏飞，等，2018. 转录因子参与植物低温胁迫响应调控机理的研究进展[J]. 生物技术通报，34(12)：1-10.]

YANG A, DAI X, ZHANG WH, 2012. A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 63(7): 2541-2556.

ZHAI H, BAI X, ZHU Y, et al., 2010. A single-repeat R3-MYB transcription factor MYBC1 negatively regulates freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 394(4): 1018-1023.

ZHAO S, 2014. Identification and characterization of R2R3 MYB gene responding to abiotic stress in citrullus lanatus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 61. [赵 爽，2014. 西瓜非生物胁迫响应 R2R3MYB 转录因子基因鉴定[D]. 武汉：华中农业大学：61.]